

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2001年 3月29日

出 願 番 号

Application Number:

特願2001-096724

出 願 人

Applicant(s):

東洋紡績株式会社

2001年12月14日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3107948

【書類名】 特許願

【整理番号】 CN01-0226

【提出日】 平成13年 3月29日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/48

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社
敦賀バイオ研究所内

【氏名】 岸本 高英

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社
敦賀バイオ研究所内

【氏名】 曾我部 敦

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社
敦賀バイオ研究所内

【氏名】 服部 静夫

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社
敦賀バイオ研究所内

【氏名】 岡 正則

【特許出願人】

【識別番号】 000003160

【氏名又は名称】 東洋紡績株式会社

【代表者】 津村 準二

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 000619

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ホルムアルデヒドの測定方法およびそれに用いる試薬組成物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試料に、グルタチオン及びグルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素を作用させ、該酵素反応より生成した化合物を分析することを特徴とするホルムアルデヒドの測定方法。

【請求項 2】 生成した S-ホルミルグルタチオンを分析することを特徴とする請求項 1 の方法。

【請求項 3】 試料に、グルタチオン、グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素、チオ NAD 類とチオ NADP 類より選ばれる 1 つの化合物、および還元型 NAD 類と還元型 NADP 類からなる群より選ばれる 1 つの化合物を作用させ、サイクリング反応を行わせしめ、該反応より変化した化合物の量を分析することを特徴とするホルムアルデヒドの測定方法。

【請求項 4】 試料に、グルタチオン、グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素、還元型チオ NAD 類と還元型チオ NADP 類から成る群より選ばれる 1 つの化合物、および NAD 類と NADP 類からなる群より選ばれる 1 つの化合物を作用させ、サイクリング反応を行わせしめ、該反応より変化した化合物の量を分析することを特徴とするホルムアルデヒドの測定方法。

【請求項 5】 生成した還元型チオ NADP 量または還元型チオ NAD 量を分析することを特徴とする請求項 3 の方法。

【請求項 6】 試料に、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、サルコシンオキシダーゼおよび必要に応じてクレアチニンアミドヒドロラーゼを作用させ、該酵素反応により生成したホルムアルデヒドを請求項 1～5 の方法で測定することを特徴とするクレアチニンまたはクレアチンの測定方法。

【請求項 7】 試料に、ベタイン、ベタイン-ホモシステインメチル転移酵素、ジメチルグリシンオキシダーゼおよび必要に応じてサルコシンオキシダーゼを作用させ、該酵素反応により生成したホルムアルデヒドを請求項 1～5 の方法で測定することを特徴とするホモシステインの測定方法。

【請求項 8】 緩衝液、グルタチオン、グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水

素酵素および該酵素反応により生成する化合物を分析するための試薬を少なくとも含有してなることを特徴とするホルムアルデヒド測定用試薬組成物。

【請求項 9】緩衝液、グルタチオン、グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素および該酵素反応により生成する S-ホルミルグルタチオンを分析するための試薬を少なくとも含有してなることを特徴とするホルムアルデヒド測定用試薬組成物。

【請求項 10】緩衝液、グルタチオン、グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素、チオ NAD 類とチオ NADP 類から成る群より選ばれる 1 つの化合物、および還元型 NAD 類と還元型 NADP 類からなる群より選ばれる 1 つの化合物を少なくとも含有してなることを特徴とするホルムアルデヒド測定用試薬組成物。

【請求項 11】緩衝液、グルタチオン、グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素、還元型チオ NAD 類と還元型チオ NADP 類から成る群より選ばれる 1 つの化合物、および NAD 類と NADP 類からなる群より選ばれる 1 つの化合物を少なくとも含有してなることを特徴とするホルムアルデヒド測定用試薬組成物。

【請求項 12】請求項 8～11 において、更に、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、サルコシンオキシダーゼおよび必要に応じてクレアチニンアミドヒドロラーゼを含有してなることを特徴とするクレアチニンまたはクレアチン測定用試薬組成物。

【請求項 13】請求項 8～11 において、更に、ベタイン、ベタイン-ホモシステインメチル転移酵素、ジメチルグリシンオキシダーゼおよび必要に応じてサルコシンオキシダーゼを含有してなることを特徴とするホモシステイン測定用試薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素を用いた、ホルムアルデヒドまたは反応中間体としてホルムアルデヒドを生成する化合物の、簡便

で高感度な測定方法、およびそのための試薬組成物に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

ホルムアルデヒドは、蛋白質、膜、DNA等と反応性に富む細胞毒であり、吸引、内服することで種々の障害を引き起こすことが知られている。近年、大気中、工業廃液、食品等に含有されるホルムアルデヒドが問題視されており、これを簡便かつ正確に測定する方法が要求されている。

【 0 0 0 3 】

ホルムアルデヒドの測定法として、H a n z 試薬、C T A 試薬 (J.Biol.Chem. 231,p813 (1958))、P u r p a l d 試薬 (Anal.Biochem.234 (1),p50(1996))などを用いて比色分析する方法、フェニルヒドラジン、フェリシアン化カリウム、クロロホルム、メタノールを組み合わせた試薬を用いる分析法が知られている。しかしこれらの方法は操作が煩雑で測定に長時間要する、或いは有害試薬を使用するなどの問題点があり、その解決手段として、グルタチオン非依存性のホルムアルデヒド脱水素酵素 (EC 2.1.1.46) を用いる酵素法が開示されている (特開平5-42000号公報、特開2000-225000号公報)。これら酵素法は、該酵素反応により、ホルムアルデヒドから蟻酸を生成する際に、同時に生成される還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、若しくはこれより導いた発色色素を分析するが、測定感度は還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドや色素の分子吸光係数に依存するため、微量のホルムアルデヒドの測定には必ずしも十分とは言えない。

【 0 0 0 4 】

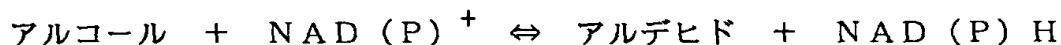
一方、微量物質の酵素による高感度定量法として、測定対象とする基質や、基質に作用する酵素の補酵素をサイクリング反応により増幅、定量する方法が知られている (検査と技術、vol.27、No8、1999年7月)。サイクリング法の1つとして、脱水素酵素と2種類の補酵素 (チオNAD類とNADH類、またはNAD類とチオNADH類) を用いて、可逆反応を利用した酵素サイクリング法による測定法が報告されている (特公平6-61278号公報、特公平6-73477号公報、特公平6-73478号公報、特公平6-73479号公報、特許第30

2 3 7 0 0 号公報、特許第 3 0 3 4 9 6 9 号公報、特許第 3 0 3 4 9 7 9 号公報、特許第 3 0 3 4 9 8 4 号公報、特許第 3 0 3 4 9 8 6 号公報、特許第 3 0 3 4 9 8 7 号公報、特許第 3 0 3 4 9 8 8 号公報、特開平 8 - 1 0 3 2 9 8 号公報)

。

【 0 0 0 5 】

特開平 4 - 3 4 1 1 9 8 号公報にはアルコールデヒドロゲナーゼおよびチオ N A D 類と N A D H 類、または N A D 類とチオ N A D H 類を用いるアルコール類またはアルデヒド類の高感度定量法が開示されている。ここで用いられるアルコールデヒドロゲナーゼの代表的な酵素として下記の反応を触媒する E C 1 . 1 . 1 . 1 の酵素が挙げられている。



D.Schomburg,D.Stephan(Eds.) Enzyme Handbook 9 (Springer-Verlag) には本酵素は、基質としてメタノールを酸化するのみならず、その生成物であるホルムアルデヒドをも酸化することが記載されている。ホルムアルデヒドは水溶液中では水和にして存在し、アルコールの状態で存在するので、アルコールデヒドロゲナーゼの被酸化基質となっており、酢酸まで酸化されるため、この酵素を用いてのホルムアルデヒドの高感度測定は成り立たない。またグルタチオン非依存性のホルムアルデヒド脱水素酵素等アルデヒド脱水素酵素は非可逆的にホルムアルデヒドを酸化するので同様にサイクリング反応による高感度測定には適用できない。

【 0 0 0 6 】

一方、分析科学の分野において、ホルムアルデヒドを中間生成物として経由して測定できる化合物があることが知られている。中でも有用なものとして、臨床検査におけるクレチニン、クレアチンおよびホモシステイン等の測定が挙げられる。

【 0 0 0 7 】

クレアチニンは臨床検査において腎機能の主要な診断マーカーであり、クレアチンの測定は、筋ジストロフィー症、甲状腺機能亢進症などの病態解析に用いられる。これらの測定法としては J a f f e 法が主流であるが特異性に関する問題

点の指摘があった。また、最近は特異性の高いクレアチニンアミドヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、サルコシンオキシダーゼ、ペルオキシダーゼを用いた酵素法も増加しているが、生体内に存在する還元物質の影響を受ける可能性の指摘があった。また、酵素法においてペルオキシダーゼの代わりにグルタチオン非依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素を用いてサルコシンオキシダーゼ反応により生成するホルムアルデヒドを上記方法にて分析する方法も報告されている (Clin. Chim. Acta, 122, p181(1982), Ann. Clin. Biochem, 29, p523(1992)) が、上述のように、微量の測定には必ずしも十分ではなかった。

【0008】

ホモシステインは、生体内では必須アミノ酸であるメチオニンが代謝を受けて生成されるSH基を有するアミノ酸であり、通常は低濃度で生体内に存在するが、血中ホモシステイン濃度の上昇をもたらすこれら代謝酵素の遺伝疾患であるホモシスチン尿症が動脈硬化症と関連のあることが知られており、近年では正常値より若干高いレベルのホモシステイン濃度においても脳梗塞、心筋梗塞、深部静脈血管症と関連付けられることが明らかにされ、現在では血中ホモシステイン濃度がこれら疾患の独立した危険因子としてされている。ホモシステインの測定法はこれまで、HPLCを用いた方法が標準法として用いられており (Clin. Chem., 39, p1590(1993))、種々の改良法も報告されているが、HPLCを用いる方法では精巧な分析装置を必要とする上、多量の検体を扱うには不適であるという欠点がある。HPLCによる分離を要しない方法として、ホモシステインをアデノシン、フルオレセイン標識S-アデノシルホモシステイン存在下でS-アデノシルホモシステイン加水分解酵素と反応させ、反応系に存在するS-アデノシルホモシステインを、抗S-アデノシルホモシステイン抗体を用いて蛍光偏向イムノアッセイを行なうことでホモシステインを測定する方法 (特表平8-506478号公報) などが知られている。また最近酵素法として、ホモシステインをホモシステインデスルフララーゼで反応させ、生成するアンモニア、 α -ケト酸または硫化水素を測定する方法 (特表2000-502262号公報)、ホモシステインに対して分解作用を有するL-メチオニナーリアーゼやD-アセチルホモセリン-リアーゼを用いて、チオール化合物の存在下で生成する硫化水素またはチ

オール化合物置換ホモシステインを測定する方法（特開 2 0 0 0 - 1 6 6 5 9 7 号公報）、ホモシステインの γ 位メルカプト基と置換可能な求核試薬の存在下、 γ -置換- α -アミノ酪酸合成酵素によりホモシステインから生成する、 γ -置換- α -アミノ酪酸または硫化水素を定量する方法（特開 2 0 0 0 - 2 2 8 9 9 8 号公報）なども報告されている。しかし、イムノアッセイ法でも一般の生化学検査に比べて時間、費用を要することが知られており、酵素反応を用いた分析法も、一般に血中ホモシステイン量が正常値で $10\ \mu\text{M}$ 程度若しくはそれ以下と微量であるため測定感度が不足していたり、あるいは使用する酵素の基質特異性により、検体中のホモシステイン以外の物質に作用するなどの点で、正確なホモシステイン量の測定には十分であるとは言えない。本発明者らは、これら課題を解決すべく、特開 2 0 0 1 - 1 7 1 9 8 号公報において、ホモシステインを基質の一つとする転移酵素を用いて、該酵素反応により生成した基質を分析するホモシステインの酵素的測定法を開示している。本特許に開示されている技術の一つとして、ホルムアルデヒドにベタイン存在下、ベタイン-ホモシステインメチル転移酵素、ジメチルグリシンオキシダーゼおよび必要に応じてサルコシンオキシダーゼを作用させて生成するホルムアルデヒドを測定する方法がある。

【 0 0 0 9 】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ホルムアルデヒドまたは反応中間体としてホルムアルデヒドが生成する化合物の高感度且つ簡便な測定を可能にすることを目的とする。

【 0 0 1 0 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記事情に鑑み、問題を解決すべく鋭意検討した結果、ホルムアルデヒドに可逆的に作用する酵素としてグルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素（EC 1.2.1.1）に着目し、試料にグルタチオン及びグルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素（EC 1.2.1.1）を作用させ、該酵素反応より生成した化合物を分析することで高感度且つ簡便にホルムアルデヒド、または反応中間体としてホルムアルデヒドを生成する化合物、例えばクレアチニン、クレアチン、ホモシステインを測定できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【 0 0 1 1 】

即ち、本発明は以下のような構成からなる。

(1) 試料に、グルタチオン及びグルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素を作用させ、該酵素反応より生成した化合物を分析することを特徴とするホルムアルデヒドの測定方法。

(2) 生成した S-ホルミルグルタチオンを分析することを特徴とする (1) の方法。

(3) 試料に、グルタチオン、グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素、チオ NAD 類とチオ NADP 類より選ばれる 1 つの化合物、および還元型 NAD 類と還元型 NADP 類からなる群より選ばれる 1 つの化合物を作用させ、サイクリング反応を行わせしめ、該反応より変化した化合物の量を分析することを特徴とするホルムアルデヒドの測定方法。

(4) 試料に、グルタチオン、グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素、還元型チオ NAD 類と還元型チオ NADP 類から成る群より選ばれる 1 つの化合物、および NAD 類と NADP 類からなる群より選ばれる 1 つの化合物を作用させ、サイクリング反応を行わせしめ、該反応より変化した化合物の量を分析することを特徴とするホルムアルデヒドの測定方法。

(5) 生成した還元型チオ NADP 量または還元型チオ NAD 量を分析することを特徴とする (4) の方法。

(6) 試料に、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、サルコシンオキシダーゼおよび必要に応じクレアチニンアミドヒドロラーゼを作用させ、該酵素反応により生成したホルムアルデヒドを (1) ~ (5) の方法で測定することを特徴とするクレアチニンまたはクレアチンの測定方法。

(7) 試料に、ベタイン、ベタイン-ホモシステインメチル転移酵素、ジメチルグリシンオキシダーゼおよび必要に応じサルコシンオキシダーゼを作用させ、該酵素反応により生成したホルムアルデヒドを (1) ~ (5) の方法で測定することを特徴とするホモシステインの測定方法。

(8) 緩衝液、グルタチオン、グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素および該酵素反応により生成する化合物を分析するための試薬を少なくとも含有

してなることを特徴とするホルムアルデヒド測定用試薬組成物。

(9) 緩衝液、グルタチオン、グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素および該酵素反応により生成するS-ホルミルグルタチオンを分析するための試薬を少なくとも含有してなることを特徴とするホルムアルデヒド測定用試薬組成物。

(10) 緩衝液、グルタチオン、グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素、チオNAD類とチオNADP類から成る群より選ばれる1つの化合物、および還元型NAD類と還元型NADP類からなる群より選ばれる1つの化合物を少なくとも含有してなることを特徴とするホルムアルデヒド測定用試薬組成物。

(11) 緩衝液、グルタチオン、グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素、還元型チオNAD類と還元型チオNADP類から成る群より選ばれる1つの化合物、およびNAD類とNADP類からなる群より選ばれる1つの化合物を少なくとも含有してなることを特徴とするホルムアルデヒド測定用試薬組成物。

(12) (8)～(11)の試薬組成物において更に、クレアチンアミジノハイドロラーゼ、サルコシンオキシダーゼおよび必要に応じクレアチニンアミドハイドロラーゼを含有してなることを特徴とするクレアチニンまたはクレアチン測定用試薬組成物。

(13) (8)～(11)の試薬組成物において更に、ベタイン、ベタイン-ホモシステインメチル転移酵素、ジメチルグリシンオキシダーゼおよび必要に応じサルコシンオキシダーゼを含有してなることを特徴とするホモシステイン測定用試薬組成物。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明のホルムアルデヒドの測定方法は、試料にグルタチオン及びグルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素を作用させ、該酵素反応より生成した化合物を分析することを特徴とする。

【0013】

本発明において使用されるグルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素は(EC 1.2.1.1)は正確には、酸化型補酵素の存在下、グルタチオンとホルムアル

デヒドより非酵素的に生成する S-ヒドロキシメチルグルタチオンを基質として、S-ホルミルグルタチオンと還元型補酵素の生成を可逆的に触媒する酵素である。

【0014】

グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素は哺乳動物、高等植物、メタノール資化性酵母、細菌などに幅広く存在し、これら給源より採取して使用することができる。例えば、市販品としては、キャンジダ (Candida) 属酵母由来の酵素などを使用することができる。具体的には、シグマ製 FORMALDEHYDE DEHYDROGENASE (Glutathione dependent) 等が挙げられる。該酵素は酵素蛋白質をコードする遺伝子を取り出し、遺伝子工学的技術により発現させたものであっても良く、更に、例えば酵素比活性や安定性を向上させるなど、酵素特性を改変した変異体や化学修飾酵素も含まれる。

【0015】

補酵素としては、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド類 (NAD 類)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸類 (NADP 類)、チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチド類 (チオ NAD 類) またはチオニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸類 (チオ NADP 類) が挙げられ、NAD 類または NADP 類は、グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素が補酵素として利用できるものを適宜使用すれば良いが、公知のものでは NAD 類として、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、アセチルピリジンアデニンジヌクレオチド、アセチルピリジンアデニンヒポキサンチンジヌクレオチド、ニコチンアミドヒポキサンチンジヌクレオチドなどが、NADP 類としてはニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸、アセチルピリジンアデニンジヌクレオチドリノ酸、アセチルピリジンアデニンヒポキサンチンジヌクレオチドリノ酸、ニコチンアミドヒポキサンチンジヌクレオチドリノ酸などが例示される。また、チオ NAD 類またはチオ NADP 類においても、グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素が補酵素として利用可能なものを適宜使用可能であるが、公知のものとして、チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、チオニコチンアミドヒポキサンチンジヌクレオチド、チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸、チオニコ

チンアミドヒポキサンチンジヌクレオチドリン酸などが具体例として挙げられる。

【 0 0 1 6 】

該酵素反応により生成される S-ホルミルグルタチオンは、紫外部における吸光度を測定することで分析することができる他、S-ホルミルグルタチオンハイドロラーゼ (EC 3.1.1.12) を用いて生成するギ酸を、更にギ酸脱水素酵素 (EC 1.2.1.2 ; EC 1.2.1.43) を用いて生成する還元型補酵素を測定すること、などにより分析することが可能である。

【 0 0 1 7 】

S-ホルミルグルタチオンハイドロラーゼは、動物臓器やメタノール資化性酵母、細菌などに存在することが知られており、これら給源より採取して使用することができる。

【 0 0 1 8 】

ギ酸脱水素酵素は、植物種子、メタノール資化性酵母、細菌などに存在する酵素でこれら給源より採取して使用することができ、市販の酵素を使用してもよい。具体的には、シグマ製 FORMATE DEHYDROGENASE 等が挙げられる。

【 0 0 1 9 】

酵素反応で生成される一方の化合物である還元型補酵素は、紫外部の吸光度、或いは蛍光により測定することができる。また、還元型補酵素をジアホラーゼやメチルフェナジウムメチルスルフェートのような電子伝達体の存在下でテトラゾリウム塩を還元する際に生成するホルマザン色素を測定することで分析することもできる。

【 0 0 2 0 】

また、本発明の別の実施態様は、試料にグルタチオン、グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素、チオ NAD 類とチオ NADP 類より選ばれる 1 つの化合物、および還元型 NAD 類と還元型 NADP 類からなる群より選ばれる 1 つの化合物を作用させ、サイクリング反応を行わせしめ、該反応より変化した化合物の量を分析することを特徴とするホルムアルデヒドの測定方法である。

【 0 0 2 1 】

本発明の更に別の実施態様は、試料にグルタチオン、グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素、還元型チオNAD類と還元型チオNADP類から成る群より選ばれる1つの化合物、およびNAD類とNADP類からなる群より選ばれる1つの化合物を作用させ、サイクリング反応を行わせしめ、該反応より変化した化合物の量を分析することを特徴とするホルムアルデヒドの測定方法である。

【0022】

該サイクリング反応では、酸化型補酵素から還元型補酵素、若しくは還元型補酵素から酸化型補酵素の生成が反応時間に比例して、基質の量に対して増幅して生成されることから、補酵素がNAD類、NADP類の場合は340nm付近の吸光度を、チオNAD類、チオNADP類の場合は400nm付近の吸光度を測定することで、ホルムアルデヒドを高感度に定量することができる。該サイクリング反応に用いるグルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素としては、ホルムアルデヒドを分解してサイクリング系外に放出するような夾雑酵素、例えばS-ホルミルグルタチオンヒドロラーゼを含まないか測定値に影響を与えない程度に含量が低いことが望ましい。またNAD(P)分解酵素についても全く含まないか測定値に影響を与えない程度に含量が低いことが望ましい。

【0023】

本発明によれば、クレアチニンまたはクレアチンを含有する試料に、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、サルコシンオキシダーゼおよび必要に応じてクレアチニンアミドヒドロラーゼを作用させることでホルムアルデヒドを生成せしめることができるので、これを上記方法で測定することでクレアチニンまたはクレアチンを測定することができる。使用するクレアチンアミジノヒドロラーゼ、サルコシンオキシダーゼ、クレアチニンアミドヒドロラーゼは特に限定されるものではなく、酵素生産能を有する微生物などから採取できる他、各種市販の酵素を用いることもできる。

【0024】

また本発明によれば、ホモシステインを含有する試料にベタイン、ベタイン-ホモシステインメチル転移酵素及びジメチルグリシンオキシダーゼを作用させる

ことでホルムアルデヒドを生成せしめることができるので、これを上記方法で測定することで、ホモシステインを測定することができる。またジメチルグリシンオキシダーゼにより生成されるサルコシンにサルコシンオキシダーゼを作用させれば2倍量のホルムアルデヒドが生成するので検出感度を増加させることができる。使用する酵素は特に限定されないが、ベタインーホモシステインメチル転移酵素は例えば動物臓器 (J.Biol.Chem.Vol.271,No.37,p22831(1998))、ジメチルグリシンオキシダーゼはアースロバクター属細菌より採取することができる (特開2001-17198号公報)。また、サルコシンオキシダーゼは各種の市販品などを使用することができる。

【0025】

また、本発明の測定対象はホルムアルデヒド以外に、反応中間体としてホルムアルデヒドが生成する化合物であればよく特に限定されないが、上記クレアチニン、クレアチン、ホモシステイン以外にも有用な測定対象としてメタノール、尿酸などが例として挙げられる (Clin.Chem.,33/12,p2204-2208(1987), Clin.Biochem.,27/2,p93-97(1994))。

【0026】

メタノールは、アルコールオキシダーゼ (EC 1.1.3.13) によりホルムアルデヒドと過酸化水素を生成する。また、尿酸は、ウリカーゼ (EC 1.7.3.3) の反応により生成される過酸化水素を、メタノールの存在下でカタラーゼ (EC 1.11.1.6) と作用させることでホルムアルデヒドを生成するので、これを上記測定方法により分析することができる。

【0027】

本発明におけるホルムアルデヒド測定用試薬組成物は、緩衝液、グルタチオン、グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素および該酵素反応により生成する化合物を分析するための試薬を少なくとも含有してなる。グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素は、上述のようなものが挙げられるが特に限定はされない。S-ホルミルグルタチオンを分析するための試薬としては上述のように、S-ホルミルグルタチオンヒドロラーゼやギ酸脱水素酵素が例示される。S-ホルミルグルタチオンヒドロラーゼとギ酸脱水素酵素についても特に種類

は限定さないが、上述した起源のものから採取して使用すればよい。

【 0 0 2 8 】

また、本発明におけるホルムアルデヒド測定用試薬組成物の別な態様としては、緩衝液、グルタチオン、グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素、チオNAD類とチオNADP類から成る群より選ばれる1つの化合物、および還元型NAD類と還元型NADP類からなる群より選ばれる1つの化合物を少なくとも含有してなる。

【 0 0 2 9 】

更に別の実施態様は、緩衝液、グルタチオン、グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素、還元型チオNAD類と還元型チオNADP類から成る群より選ばれる1つの化合物、およびNAD類とNADP類からなる群より選ばれる1つの化合物を少なくとも含有してなる。NAD類、NADP類、チオNAD類、チオNADP類は上述のようなものを用いることができる。

【 0 0 3 0 】

本発明は上記試薬以外に、更にクレアチンアミジノヒドロラーゼ、サルコシンオキシダーゼおよび必要に応じてクレアチニンアミドヒドロラーゼを含有してなることを含む。また、別に、更にベタイン、ベタインーホモシステインメチル転移酵素、ジメチルグリシンオキシダーゼを少なくとも含有してもよい。これら酵素は上述したようなものを適宜利用可能である。

【 0 0 3 1 】

本発明の試薬組成物において使用される緩衝液としては、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、GOOD緩衝液などが挙げられる。トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液は濃度、温度によりpHの変動を受けやすいが、安価という利点がある。一方、GOOD緩衝液は具体的にはMES、Bis-Tris、ADA、PIPES、ACES、BES、MOPS、TES、HEPES、Tricine、Bicine、POPSO、TAPS、CHES、CAPSなどが例示され、臨床診断薬用として多用されている。これら緩衝液の種類、濃度およびpHは、各試薬成分の保存および酵素反応など目的に応じて一種もしくは複数を選択されるが、いずれの緩衝液を用いるに際しても、酵素反応時のpHとしては

5. 0 ~ 1 0 . 0 の範囲で使用されることが好ましい。

【 0 0 3 2 】

また、本発明の試薬組成物は、金属塩、蛋白質、アミノ酸、糖、有機酸などを安定化剤として使用することができる。金属塩としてはナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、鉄、銅、亜鉛、マンガンなどの塩が挙げられる。蛋白質としては酵素反応に影響を与えないものが望ましいが、例えば牛血清アルブミン、卵アルブミン、ゼラチンなどが挙げられる。アミノ酸としては、グリシン、リジン、グルタミン酸、グリシルグリシン、ポリリジンなどを挙げるができる。糖としては、単糖、二糖、オリゴ糖、多糖およびこれらの誘導体を用いることができる。具体的には、グルコース、フラクトース、ガラクトース、マンノース、キシロース、ラクトース、シュクロース、マルトース、トレハロース、マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトシルシクロデキストリン、 α -シクロデキストリン、 β -シクロデキストリン、 γ -シクロデキストリン、デキストリン、アミロース、グリコーゲン、デンプン、イヌリン、グルコサミン、イノシトール、マンニトール、ソルビトール、リビトール、デオキシグルコースなどが挙げられる。有機酸としては、 α -ケトグルタル酸、リンゴ酸、フマル酸、グルコン酸、コール酸、デオキシコール酸などが例示される。その他、ホウ酸、ホウ砂、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸アンモニウム、グリセロール、フィコールなども使用可能である。

【 0 0 3 3 】

更に、本発明の試薬組成物には、試薬性能に悪影響を及ぼさない範囲で防腐剤や界面活性剤を添加してもよい。防腐剤としてはアジ化ナトリウム、キレート剤、各種抗生物質、防菌剤、防黴剤などが挙げられる。具体的にはアジ化ナトリウムの他、EDTA及びその塩（金属キレートを含む）、CyDTA、GHEG、DPTA-OH、DTPA、EDDA、EDDP、EDDPO、EDTA-OH、EDTPO、EGTA、HBED、HDTA、HIDA、IDA、Methyl-EDTA、NTA、NTP、NTPO、TTHA（これらは同仁より市販）等のキレート剤、BND、CAA、HPO、IZU、MIT（ロッシュより市販）、ProClin150、ProClin300（ローム&ハースより市販）、ベンザルコニウムクロリド

、KathonCG、p-ヒドロキシメチルベンゾエート等の防菌（黴）剤、アンフォテリシンB、アンピシリン、プラスティシジンS、クロラムフェニコール、ジヒドロストレプトマイシン、クリンダマイシン、シクロヘキシミド、フィリピン、G418、ゲンタマイシン、ハイグロマイシン、カナマイシン、リンコマイシン、ネオマイシン、ロモフンジン、ポリオキシン、ペニシリン、スルファメチゾール、テトラサイクリン等の抗生物質が使用可能である。界面活性剤としては、非イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、両性界面活性剤が挙げられる。具体的には、アデカトール720N、B-795、B-797、LO-7、NP-690、NP-695、NP-720、PC-8、SO-120、SO-145、ブリジェ35、98、700、エマルゲン109P、430、460、707、709、810、911、935、950、A-60、B66、n-ドデシルマルトシド、ゲナポールX-080、MEGA-7、8、9、10、ニッコールBL-9EX、BL-20TX、HCD-100、MGO、MYO-6、MYL-10、NP-18TX、OP-10、TL-10、TMGO5、SL-10、オクチル α -グルコシド、オクチル β -グルコシド、オクチルチオグルコシド、オクチルチオガラクトシド、ペンタエチレングリコールドデシルエーテル、ポリエチレンエーテルW-1、ブルロニックF-68、L-71、P-103、ノニデットP40、レオドール460、TWL-103、TWL-106、サポニン、サルコシネートPN、スパン20、85、SM1080、スクロースモノラウレート、テトロニック704、テシット、トリトンX-100、X-114、X-305、ツイーン20、40、80等の非イオン性界面活性剤、ビス（ヒドロキシエチル）-（ステアロイルアミノメチルカルボニルオキシ）エチルアミンクロリド、メチル硫酸ベンジルラウリルメチルスルフォニウム、2-[(4-*t*-オクチルフェノキシ)エトキシ]エチルモルフォリンクロリド、ラウリルピリジニウムクロリド、ラウリル（トリ-*p*-トリル）ホスホニウムクロリド、ラウリルフェニルシクロテトラメチレンホフホニウムブロミド、セチルピリジニウムクロリド、セチルトリメチルアンモニウムクロリド、（ポリオキシエチレン）ラウリルアミン、などの陽イオン性界面活性剤、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸、N-ラウロイルサルコシン、タウロコール酸など

の陰イオン性界面活性剤、CHAPS、CHAPSO、N，N－ビス（オクチルアミノエチル）グリシン、N－カルボキシメチル－N－（ステアリルオキシメチル）ピリジウムベタイン、N－パルミチルスルホタウリン、ラウリルジメチルアミノオキシド、N－（ラウリルチオエトキシ）メチル－N，N－ジメチルベタインなどの両性界面活性剤が使用できる。

【 0 0 3 4 】

本発明の測定方法において使用される上記試薬成分は、同一の試薬中に保存することもできるが、互いに干渉を与える成分が存在する、または単一の保存条件で安定性の確保が難しい場合には、構成成分を分割して保存することが好ましい。

【 0 0 3 5 】

【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【 0 0 3 6 】

実施例 1 グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素の取得

本発明のグルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素の活性測定は以下の試薬及び測定条件にて行った。

〈試薬〉

試薬 A 1 0 0 m M リン酸カリウム緩衝液（p H 7 . 5）

試薬 B 1 0 m M 酸化型 N A D 水溶液

試薬 C 2 0 m M ホルムアルデヒド水溶液

試薬 D 2 0 m M グルタチオン水溶液

〈測定条件〉

試薬 A、試薬 B、試薬 C および試薬 D を各 2 . 1 m l、0 . 3 m l、0 . 3 m l、0 . 3 m l の割合で混合し、試薬混液を作成する。この試薬混液 3 m l を 3 7 ℃ で約 5 分間予備加温した後、0 . 1 m l の酵素溶液を加えて混和し、3 7 ℃ で 4 分間反応させる。この時、3 4 0 n m における 1 分間当たりの吸光度変化を測定する。盲検は酵素溶液の代わりに蒸留水を試薬混液に加えて、以下同様に吸光

度変化を測定する。上記条件にて1分間に1マイクロモルの過酸化水素を生成する酵素量を1単位(U)とする。

メタノール資化性酵母ハンゼヌラ・ノンファーマンタンス (*Hansenula nonfermentans*) I F O 1 4 7 3 株を60ml YPD培地(1% D-グルコース、1%ポリペプトン、1%酵母エキス; pH 5.0)に一白金耳植菌し、30℃、24時間振とう培養後、6Lのグルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素生産培地(2% メタノール、0.5% D-グルコース、1% ポリペプトン、1.6%酵母エキス、0.2%リン酸水素二カリウム、0.7%リン酸二水素一カリウム)に移し、30℃、48時間通気攪拌培養した。培養終了後、培養液を遠心分離し、20mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)に懸濁した。次いで菌体をガラスビーズで破碎し、遠心分離を行い上清液を得た。得られた酵素液をポリエチレンイミンによる除核酸処理および硫酸分画後、セファデックスG-25による脱塩処理、DEAEセファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびスーパーデックス200ゲル濾過クロマトグラフィーにより分離精製し、精製酵素標品約90mgを得た。該方法により得た標品は電気泳動(SDS-PAGE)的に単一なバンドを示し、この時の比活性は約250U/mg蛋白質であった。

【0037】

実施例2 ホルムアルデヒド標準液の測定(1)

本実施例で使用するS-ホルミルグルタチオンヒドロラーゼの活性測定は*Biochimica. et Biophysica Acta*, 614(1980)p81-91記載の、またギ酸脱水素酵素の酵素活性は*Eur. J.*

Biochem. (1976) Feb 2; 62(1) p151-160記載の方法にそれぞれ従って実施した。

本実施例で使用するS-ホルミルグルタチオンヒドロラーゼは以下のようにして取得した。

メタノール資化性酵母キャンジダ・ボイディニイ (*Candida boidinii*) I F O 1 4 7 3 株を60ml YPD培地(1% D-グルコース、1%ポリペプトン、1%酵母エキス; pH 5.0)に一白金耳植菌し、30℃、24時間振とう培

養後、6 LのS-ホルミルグルタチオンヒドロラーゼ脱水素酵素生産培地（2 % メタノール、0.5 % D-グルコース、1 % ポリペプトン、1.6 % 酵母エキス、0.2 % リン酸水素二カリウム、0.7 % リン酸二水素一カリウム）に移し、30℃、48時間通気攪拌培養した。培養終了後、培養液を遠心分離し、20 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.5）に懸濁した。次いで菌体をガラスビーズで破碎した後、遠心分離を行い上清液を得た。得られた酵素液をポリエチレンイミンによる除核酸処理および硫酸分画後、セファデックスG-25による脱塩処理、DEAEセファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびスーパーデックス200ゲル濾過クロマトグラフィーにより分離精製し、精製酵素標品約10 mgを得た。該方法により得た標品は電気泳動（SDS-PAGE）的にほぼ単一のバンドを示し、この時の比活性は約900 U/mg蛋白質であった。

種々の濃度のホルムアルデヒド水溶液10 μ Lを試料に、10 /ml グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素（実施例1で調製）、1 mM酸化型NAD、3 mMグルタチオン、5 U/ml S-ホルミルグルタチオンヒドロラーゼ（上記で調製したもの）、5 U/ml ギ酸脱水素酵素（シグマ製）をそれぞれ含む50 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.5）300 μ Lと混合し、37℃で10分間反応させ、340 nmの吸光度を測定した。盲検はホルムアルデヒド水溶液の代わりに蒸留水を試薬混液に加えて、以下同様に吸光度変化を測定した。反応終了時の吸光度と試料のホルムアルデヒド濃度の関係は表1および図1に示す通りであり、ホルムアルデヒド濃度が0～500 μ Mの範囲において直線性を示し、定量が可能であった。

【0038】

【表 1】

ホルムアルデヒド濃度 ($\mu\text{M/L}$)	340 nm における吸光度変化
0	0
100	0.041
200	0.083
300	0.120
400	0.155
500	0.201

【0039】

実施例 3 ホルムアルデヒド標準液の測定 (2)

種々の濃度のホルムアルデヒド水溶液 $10\mu\text{L}$ を試料に、 100U/ml グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素 (実施例 1 で調製)、 1mM 酸化型チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、 0.5mM 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、 3mM グルタチオン、 0.1% トリトン X-100 をそれぞれ含む 50mM HEPES 緩衝液 ($\text{pH} 8.0$) $300\mu\text{L}$ と混合し、 37°C で 5 分間サイクリング反応を実施し、 405nm の吸光度を測定した。盲検はホルムアルデヒド水溶液の代わりに蒸留水を試薬混液に加えて、以下同様に吸光度変化を測定した。反応開始後 1 分後と 5 分後の吸光度の増加と、試料中のホルムアルデヒド濃度の関係は表 2 および図 2 に示す通りであり、ホルムアルデヒド濃度が $0\sim 50\mu\text{M}$ の範囲において直線性を示し、定量が可能であった。

【0040】

【表 2】

ホルムアルデヒド濃度($\mu\text{M/L}$)	405 nmにおける吸光度変化
0	0
1	0. 0017
2	0. 0065
3	0. 0091
5	0. 0120
10	0. 0247
15	0. 0390
20	0. 0494
30	0. 0786
40	0. 0986
50	0. 120

【0041】

実施例4 クレアチニン標準液の測定

種々の濃度のクレアチニン水溶液 $5\mu\text{L}$ を試料に、 100U/ml クレアチニンアミドヒドロラーゼ（東洋紡績製；CNH-311）、 50U/ml クレアチンアミジノヒドロラーゼ（東洋紡績製；CRH-221）、 10U/ml サルコシンオキシダーゼ（東洋紡績製；SAO-341）、 0.1% トリトンX-100 をそれぞれ含む 50mM HEPES 緩衝液（ $\text{pH}8.0$ ） $200\mu\text{l}$ と混合し、 37°C で5分間反応させた後、 300U/ml グルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素（実施例1で調製）、 3mM 酸化型チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、 1.5mM 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、 9mM グルタチオン、 0.1% トリトンX-100 をそれぞれ含む 50mM HEPES 緩衝液（ $\text{pH}8.0$ ） $100\mu\text{l}$ を加え、 37°C で5分間サイクリング反応を実施し、 405nm の吸光度を測定した。盲検はクレアチニン水溶液の代わりに蒸留水を試薬混液に加えて、以下同様に吸光度変化を測定した。反応開始後1分後と5分後の吸光度の増加と、試料中のクレチニン濃度の関係は表3および図3に示す通りであり、クレチニン濃度が $0\sim100\mu\text{M}$ の範囲におい

て直線性を示し、定量が可能であった。

【0042】

【表3】

クレアチニン 濃度(μ M/L)	405nmにお ける吸光度変化
0	0
10	0.011
20	0.023
40	0.042
60	0.066
80	0.084
100	0.113

【0043】

実施例5 ホモシステイン標準液の測定

本実施例で使用するベタインーホモシステインメチル転移酵素の活性測定は以下の試薬及び測定条件で行った。

<試薬>

試薬A 50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)

試薬B 100mM DL-ホモシステイン溶液(試薬Aで溶解)

試薬C 100mMベタイン(試薬Aで溶解)

試薬D 0.2%ペンタシアノアンミン鉄(III)ナトリウム水溶液

試薬E 酢酸

試薬F 10%亜硝酸ナトリウム水溶液

<測定条件>

酵素溶液2.3mlに試薬B、試薬Cを各0.075ml、0.125mlを加えて混和後、37℃で1時間反応させる。反応終了後、直ちに試薬Dを5ml加えて攪拌し、一分間放置後、更に試薬E、試薬Fの順に各1mlずつ加えて攪拌する。室温で30分間放置後520nmにおける吸光度を測定する。試薬Aに溶解したL-メチオニンを酵素溶液の代わりに用いて同様の手順にて測定した吸光度より標準曲線を作成し、これから酵素反応により生成したメチオニンの量を測

定する。上記条件にて1時間に1マイクロモルのメチオニンを生成する酵素量を1単位(U)とする。

また、本実施例で使用するベタイン-ホモシステインメチル転移酵素は以下のようにして取得した。

遺伝子の塩基配列が公知であるヒト由来のベタイン-ホモシステインメチル転移酵素(J.Biol.Chem.Vol.271,No.37,p22831(1998))をコードする遺伝子全長が増幅可能な2種のプライマー(配列表の配列番号1および2に記載)を作成し、これを用いてヒト肝臓cDNA(クロンテック製)を鋳型として、ポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)法によりヒト由来のベタイン-ホモシステインメチル転移酵素をコードするDNA断片を増幅した。PCRは以下に示す反応液組成及び反応条件にて実施した。

<反応液組成>

KODPlus DNAポリメラーゼ(東洋紡績製) 1Unit/50 μ l

10倍濃度添付バッファー 5 μ l/50 μ l

鋳型cDNA 1.5 μ g/50 μ l

dATP、dTTP、dGTP、dCTP 各0.2mM

プライマー 各25pmols/50 μ l

<反応条件; 下記(2)~(4)を計30サイクル実施した>

(1) 95℃、2分間(変性)

(2) 95℃、30秒間(変性)

(3) 60℃、30秒間(アニーリング)

(4) 68℃、1分間(伸長反応)

PCR反応後、反応液の一部をアガロースゲル電気泳動に供し、約1.2Kbpの単一の増幅バンドを確認した。この増幅断片をDNA断片精製キット(MagExtactor PCR&Gel Clean Up; 東洋紡績製)を用いて回収した後、このDNA断片をNdeIおよびBamHI制限酵素にて処理した。次いで、pET11aプラスミド(ストラタジーン製)をNdeIおよびBamHI制限酵素で処理し、これを上記DNA断片とT4 DNAリガーゼ(東洋紡績製)を用いて連結した。これを用いてEpicurian Coli BL21 (DE3) -CodonPlusTM-RIL コンピテントセル

(ストラタジーン製)を形質転換し、アンピシリンを含むLB寒天培地(1%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl、100 μ g/mlアンピシリン; pH7.2)に塗布し、37℃で16時間培養した。

得られたコロニーは、アンピシリンを含むLB培地60mlで30℃、16時間振とう培養後、塩化亜鉛およびアンピシリンを含む×2YT培地(1.6%ポリペプトン、1%酵母エキス、0.5%NaCl、34 μ g/ml塩化亜鉛、100mg/mlアンピシリン; pH7.2)6Lに接種し、37℃で通気攪拌培養した。約2.5時間後、培養液の600nmの吸光度が約1.0に達した時点で、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシドを1mMになるように添加し、更に4時間培養を行った。培養終了後、培養液を遠心分離し、菌体を5mM2-メルカプトエタノール、1mMEDTAを含む20mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)に懸濁した。次いで菌体フレンチプレスで破碎し、遠心分離を行い、上清液を得た。得られた酵素液をポリエチレンイミンによる除核酸処理後、セファデックスG-25による脱塩処理、DEAEセファロースクロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、スーパーデックス200ゲル濾過クロマトグラフィーにより分離精製し、精製酵素標品約50mgを得た。該方法により得た標品は、電気泳動(SDS-PAGE)的に単一なバンドを示し、この時の比活性は約2.1U/mg-蛋白質であった。

本実施例で使用するジメチルグリシンオキシダーゼの活性測定は以下の試薬及び測定条件で行った。

<試薬>

試薬A 100mMジメチルグリシン溶液(100mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)で溶解)

試薬B 0.1%4-アミノアンチピリン水溶液

試薬C 0.1%フェノール水溶液

試薬D 25U/mlペルオキシダーゼ(東洋紡績製;PEO-301)水溶液

<測定条件>

試薬A、試薬B、試薬Cおよび試薬Dを各1.5ml、0.3ml、0.6ml

、0.6 ml の割合で混合し、試薬混液を作成する。この試薬混液 3 ml を 37℃ で約 5 分間予備加温した後、0.1 ml の酵素溶液を加えて混和し、37℃ で 4 分間反応させる。この時、500 nm における 1 分間当たりの吸光度変化を測定する。盲検は酵素溶液の代わりに蒸留水を試薬混液に加えて、以下同様に吸光度変化を測定した。上記条件にて 1 分間に 1 マイクロモルの過酸化水素を生成する酵素量を 1 単位 (U) とする。

また、本実施例で使用するジメチルグリシンオキシダーゼは以下のようにして取得した。

アルスロバクター・ニコチアナエ (*Arthrobacter nicotianae*) IF014234 株を 60 ml LB 培地 (1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、0.5% NaCl; pH 7.2) に一白金耳植菌し、30℃、16 時間振とう培養後、6 L のジメチルグリシンオキシダーゼ生産培地 (2% ベタイン、1% ポリペプトン、1.6% 酵母エキス、1.4% リン酸水素二カリウム、0.55% リン酸二水素一カリウム) に移し、30℃、40 時間通気攪拌培養した。培養終了後、培養液を遠心分離し、20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) に懸濁した。次いで菌体をガラスビーズで破碎した後、遠心分離を行い上清液を得た。得られた酵素液をポリエチレンイミンによる除核酸処理および硫酸分画後、セファデックス G-25 による脱塩処理、DEAE セファロースクロマトグラフィー、フェニルセファロースクロマトグラフィー、スーパーデックス 200 ゲル濾過クロマトグラフィーにより分離精製し、精製酵素標品約 110 mg を得た。該方法により得た標品は電気泳動 (SDS-PAGE) 的に単一なバンドを示し、この時の比活性は約 9.3 U/mg 蛋白質であった。

種々の濃度の L-ホモシスチン水溶液を 0.5 mM ジチオスレイトール中で、37℃、30 分間加温して生成した L-ホモシステイン 10 μL を試料に、20 mM ベタイン、1 U/ml ベタイン-ホモシステインメチル転移酵素 (上記で調製したもの)、7 U/ml ジメチルグリシンオキシダーゼ (上記で調製したもの)、5 U/ml サルコシンオキシダーゼ (東洋紡績製; SAO-341) をそれぞれ含む 20 mM PIPES 緩衝液 (pH 7.3) 200 μl と混合し、37℃ で 5 分間反応させた後、300 U/ml グルタチオン依存性ホルムアルデヒド

脱水素酵素（実施例 1 で調製）、3 mM 酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、1.5 mM 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、9 mM グルタチオン、0.1% トリトン X-100 をそれぞれ含む 50 mM HEPES 緩衝液（pH 8.2）100 μ l を加え、37℃ で 5 分間サイクリング反応を実施し、405 nm の吸光度を測定した。盲検は L-ホモシステイン溶液の代わりに 0.5 mM ジチオスレイトールを試薬混液に加えて、以下同様に吸光度変化を測定した。反応開始後 1 分後と 5 分後の吸光度の増加と、試料中のホモシステイン濃度の関係は表 4 および図 4 に示す通りであり、ホモシステイン濃度が 0 ~ 100 μ M の範囲において直線性を示し、定量が可能であった。

【0044】

【表 4】

Ｌ－ホモシステイン濃度（ μ M/L）	405 nm における吸光度変化
0	0
1	0.0024
2	0.0062
3	0.0113
5	0.0226
10	0.0336
15	0.0589
20	0.0717
30	0.1092
40	0.1396
50	0.1720

【0045】

【発明の効果】

本発明によれば、ホルムアルデヒドまたは反応中間体としてホルムアルデヒドが生成するクレアチニン、クレアチン、ホモシステインの高感度且つ簡便な測定が可能である。

【0046】

【配列表】

<110> TOYO BOSEKI KABUSHIKI KAISHA

<120> METHOD OF FORMALDEHYDE ASSAY AND COMPOSITION OF REAGENT FOR FORMAL
DEHYDE ASSAY

<130> 01-

<141> 2001-03-

<160> 2

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the sequence of designed polynucleotide for PCR primer

<400> 1

gcaattccat atgccacccg ttgggggcaa aaaggccaag

40

【 0 0 4 7 】

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> the sequence of designed polynucleotide for PCR primer

<400> 2

atcgcgatc caggctactg tgatttgaat ttttgtttt

40

【図面の簡単な説明】

【図 1】

実施例 2 における、吸光度とホルムアルデヒド濃度との関係を示す図である。

【図 2】

実施例 3 における、吸光度とホルムアルデヒド濃度との関係を示す図である。

【図 3】

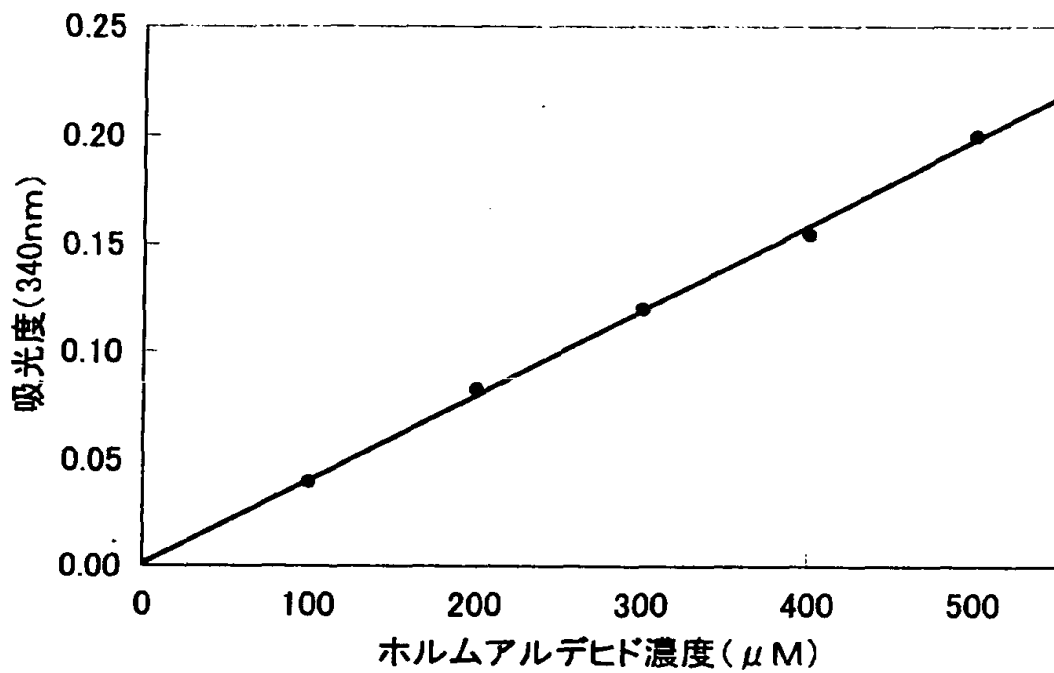
実施例 4 における、吸光度とクレアチニン濃度との関係を示す図である。

【図 4】

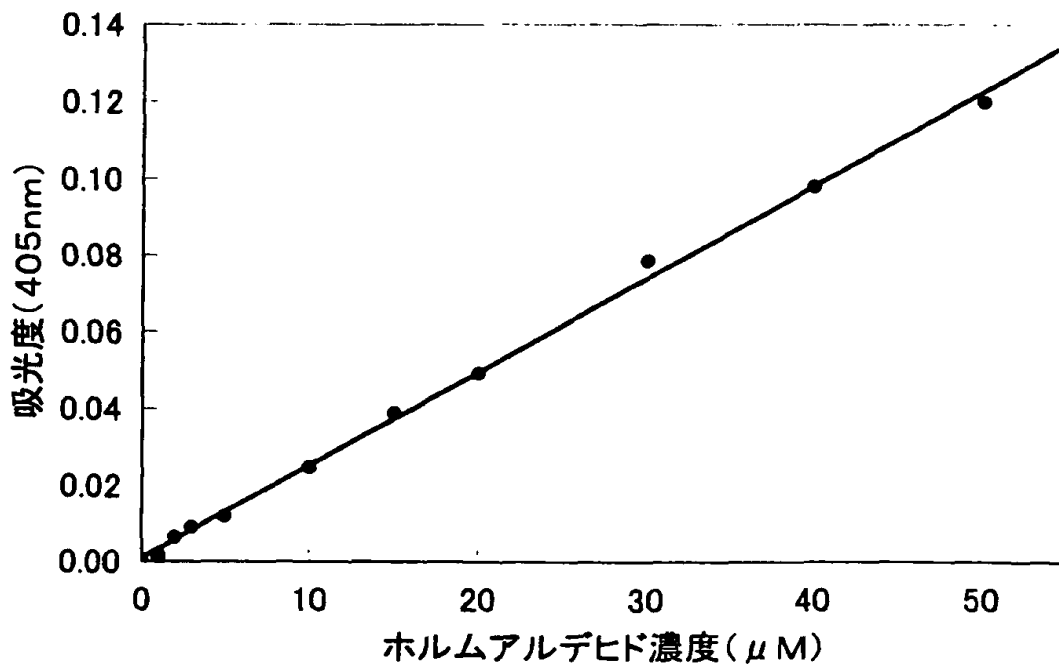
実施例 5 における、吸光度とホモシステイン濃度との関係を示す図である。

【書類名】 図面

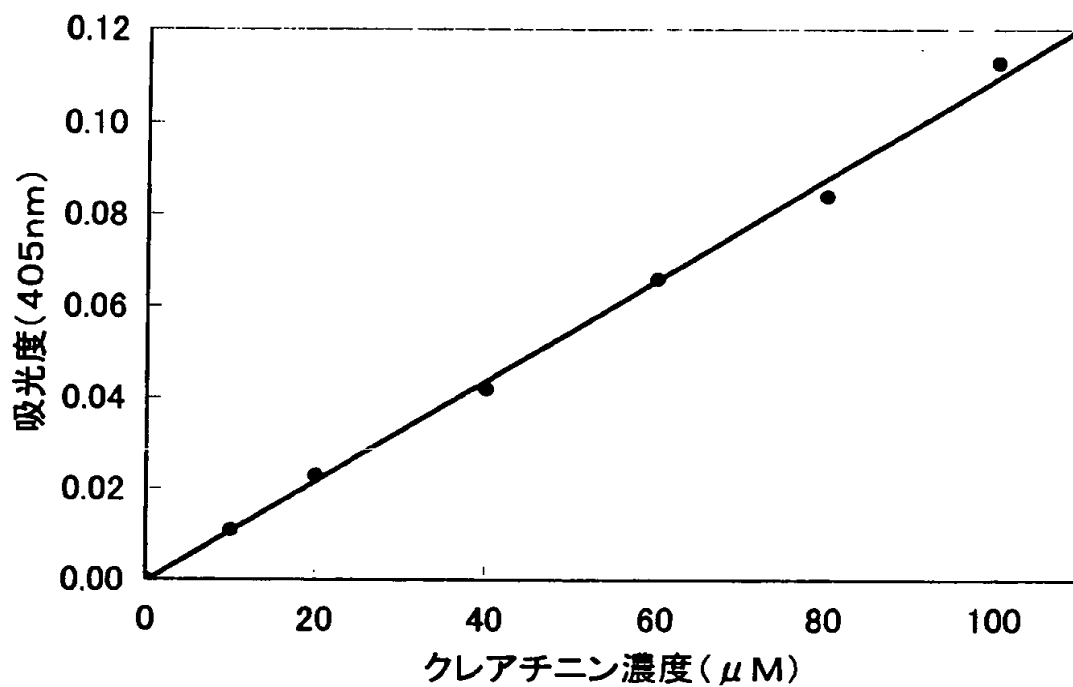
【図 1】



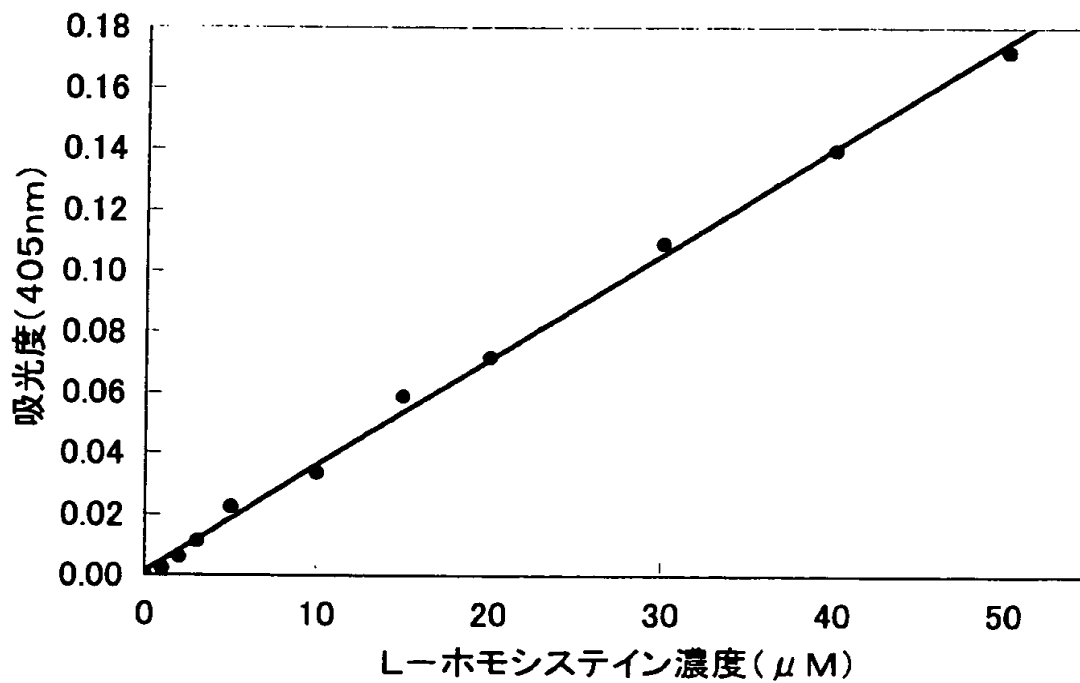
【図 2】



【図3】



【図4】



【書類名】 要約書

【課題】ホルムアルデヒドまたは反応中間体としてホルムアルデヒドが生成する化合物の高感度且つ簡便な測定を可能にする。

【解決手段】試料に、グルタチオン及びグルタチオン依存性ホルムアルデヒド脱水素酵素を作用させ、該酵素反応より生成した化合物を分析することを特徴とするホルムアルデヒドの測定方法。

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003160]

1. 変更年月日 1990年 8月10日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

氏 名 東洋紡績株式会社